

ポリマー型水溶性ペプチドグリカンはToll-like receptor2とNOD2の両経路に作用して相乗的にヒト単球系細胞を活性化する

著者	長束 みずほ
雑誌名	東北大学歯学雑誌
巻	26
号	1
ページ	T11-T18
発行年	2007-06
URL	http://hdl.handle.net/10097/40527

ポリマー型水溶性ペプチドグリカンが Toll-like receptor 2 と NOD2 の両経路に作用して相乗的にヒト単球系細胞を活性化する

長 束 みずほ

東北大学大学院歯学研究科 口腔病態外科学講座 口腔外科学分野

(指導: 越後 成志教授)

内容要旨: ポリマー構造を有するペプチドグリカン (PGN) は Toll-like receptor (TLR)2 を介して作用するとの知見がある。他方、細胞内の NOD ファミリー分子の NOD2 は PGN のムラミルジペプチド (MDP) 構造を認識する。本研究では、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 155 の PGN を酵素処理して得た可溶性フラグメントのヒト単球系 THP-1 細胞活性化作用をそのレセプターシステムに着目して検討した。テスト標品としては、*S. epidermidis* の精製細胞壁、同細胞壁より調製した PGN、PGN を SALE-endopeptidase 処理して得たポリマー型の水溶性 PGN である SEPS、SEPS をさらに M-1 muramidase 処理して得たモノマー型の SEPS-M 等を供試した。その結果、SEPS は PGN や SEPS-M に比較して極めて強力なサイトカイン誘導作用を示した。RNA 干渉 (RNAi) 法により TLR2 あるいは NOD2 遺伝子をノックダウンした細胞では、SEPS の強い活性が著しく減弱した。他方、TLR2 リガンドの PGN と合成 NOD2 リガンドである MDP を同時に THP-1 細胞培養系に加えると相乗的な活性が認められた。以上の知見は、ポリマー型 PGN が NOD2 ならびに TLR2 の両方に作用して相乗的にヒト単球系細胞を活性化することを示唆している。

Key words: ペプチドグリカン, Toll-like receptor 2, NOD2, 相乗作用, 単球

緒 言

ペプチドグリカン peptidoglycan (PGN) は、ほとんどすべての細菌種の細胞壁をなす構造物であり免疫強化作用をはじめとする多彩な生物活性が知られている¹⁾。PGN は *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β (1-4) 結合したグリカン鎖のムラミン酸に軸ペプチドが結合し、軸ペプチド間に架橋を有する複雑な網状構造をなしている²⁾。PGN の化学構造はいくつかのタイプに分かれる。重要なのはムラミン酸から三番目のアミノ酸、すなわち架橋に係わるアミノ酸である。*Staphylococcus*, *Streptococcus* など多くのグラム陽性菌の PGN では L-Lys (リシン型 PGN)、大部分のグラム陰性菌と結核菌類縁菌など一部のグラム陽性菌では、ジアミノピメリン酸 (DAP) (DAP 型 PGN) がこの位置を占める。1970 年代にムラミルジペプチド (MurNAc-L-Ala-D-isoGln: MDP) が PGN のアジュバント活性を担う最小有効構造であると証明された^{3,4)} が、そのレセプターは近年まで不明であった。2003 年に MDP のレセプターは細胞内に存在する nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) ファミリー分子の NOD2 であることが解明された^{5,6)}。ついで、PGN の別の活性構造である DAP 含有 PGN フラグメントのレセプターが NOD1 であることが報告された^{7,8)}。

近年 Toll-like receptor (TLR) 系が菌体成分のシグナル伝達を担うことが次々と明らかにされている⁹⁾。PGN についても TLR2 をレセプターとするとの知見が報告された¹⁰⁻¹²⁾。しかし、

PGN の活性中心に相当する MDP の活性は TLR2 非依存的に発現する^{13,14)}。Yoshimura ら¹⁵⁾ は、TLR2 リガンド構造を解析した。その結果、本研究でも供試した *Staphylococcus epidermidis* ATCC 155 の精製細胞壁、PGN ならびに PGN を SALE-endopeptidase 処理して調製した水溶性 PGN の SEPS はいずれも TLR2 アゴニスト作用を示した。ちなみに SALE は PGN の架橋部分を切断して溶解させるので、グリカン鎖は保持されるため、SEPS はポリマー構造を保持している。他方、SEPS のグリカン鎖をさらに M-1 muramidase で切断したモノマー型の SEPS-M や合成 MDP は TLR2 アゴニスト作用を欠いていた。すなわち、PGN が TLR2 活性を発揮するにはグリカン鎖が保持されたポリマー構造が必要であると考えられる。最近になって、*S. aureus* の PGN に関しても同様の知見が報告されている¹⁶⁾。

Uehara ら¹⁷⁾ は、活性型ビタミン D₃ で処理して分化度を高めたヒト単球系 THP-1 細胞を NOD2 アゴニストである MDP と様々な TLR 系アゴニストで共刺激すると、細胞は相乗的に活性化されて高レベルの炎症性サイトカインを産生すると報告した。以上の知見をふまえて次のように考えた。*S. epidermidis* の PGN ならびに可溶性 PGN ポリマーの SEPS は TLR2 を介して作用を発揮する。一方、その部分構造である MDP は NOD2 を介して作用を発揮すると考えられる。さらに、SEPS は TLR2 と NOD2 の両経路で細胞を活性化する可能性がある。実際、SEPS は極めて強力な作用を発揮することが知られている。そこで本研究では、*S. epidermidis* の精製細胞壁、その PGN、さらに PGN を酵素処理して得た可溶性フラグ

メントのヒト単球系 THP-1 細胞活性化作用をそのレセプターシステムに着目して検討して, SEPS の強力な活性の機序解明を目指した。

材料および方法

1. 細胞とその培養

ヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 細胞 (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター, 仙台) は, RPMI 1640 培養液 (Nissui, 東京) に加熱非働化した牛胎仔血清 (JRH, Lenexa, KS, 米国) 10% を添加し 37°C 下で培養を行った。培養液の交換は 2~3 日毎に行った。THP-1 細胞 (2×10^5 cells/ml) は, 活性型ビタミン D₃ 誘導体である 22-oxyacalcitriol (OCT)¹⁸⁾ を 0.1 μ M 添加して 37°C で 3 日間処理した。処理した THP-1 細胞はマクロファージ様細胞に分化していた。

2. テスト物質

S. epidermidis ATCC 155 菌体をガラスビーズを用いて機械破碎した後, 細胞壁画分を回収し, トリプシン等で処理して精製細胞壁を得た¹⁹⁾。精製細胞壁をトリクロロ酢酸で処理して特殊構造を除いた PGN を調製した¹⁹⁾。同 PGN を SALE-endopeptidase²⁰⁾ 処理して架橋部分を切断後, カラム分画してグリカン鎖を保持した可溶性 PGN ポリマーである SEPS²¹⁾ を調製した。さらに SEPS のグリカン鎖を M-1 muramidase²²⁾ 処理後, カラム分画して PGN のモノマー構造を有する SEPS-M²¹⁾

を調製した。以上の標品は, いずれも本学口腔微生物学分野保有のものから分与を受けて供試した。*S. aureus* PGN は Fluka (Buchs, スイス) より購入した。TLR2/6 アゴニストのマイコプラズマ型合成リポペプチド FSL-1 は EMC microcollections (Tübingen, ドイツ) より購入した。

3. サイトカイン測定

OCT 処理した THP-1 細胞を回収し, リン酸緩衝食水 (PBS) にて 2 回洗浄した。洗浄後, 10%FCS 添加 RPMI 1640 培養液に浮遊させた細胞 (1×10^5 cell/200 μ l) を 96 穴平底プレートに播種した。これに, テスト物質を添加し, 37°C で 24 時間培養後, 上清を回収し, サイトカイン産生量を酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) キット (BD Biosciences, San Diego, CA, 米国) にて測定した。使用したキットは IL-8, IL-6, IL-1 β , 腫瘍壊死因子 (TNF- α) 測定用である。各サイトカイン量は Softmax データ解析プログラムにて, 標準タンパクと比較定量することにより濃度を求めた。

4. RNA 干渉 (RNAi) 法

OCT 処理した THP-1 細胞を回収し PBS にて 2 回洗浄した。洗浄後, 20%FCS 添加 Opti-MEM 培養液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 米国) 中で THP-1 細胞 (2×10^6 cell/ml) を 50 μ l ずつ 96 穴平底プレートに播種した。RNAi 法実験用の NOD2 short interfering (si)RNA, TLR2 siRNA¹⁷⁾ は Opti-MEM 培養液で希釈した。別のチューブに Lipofectamine 2000

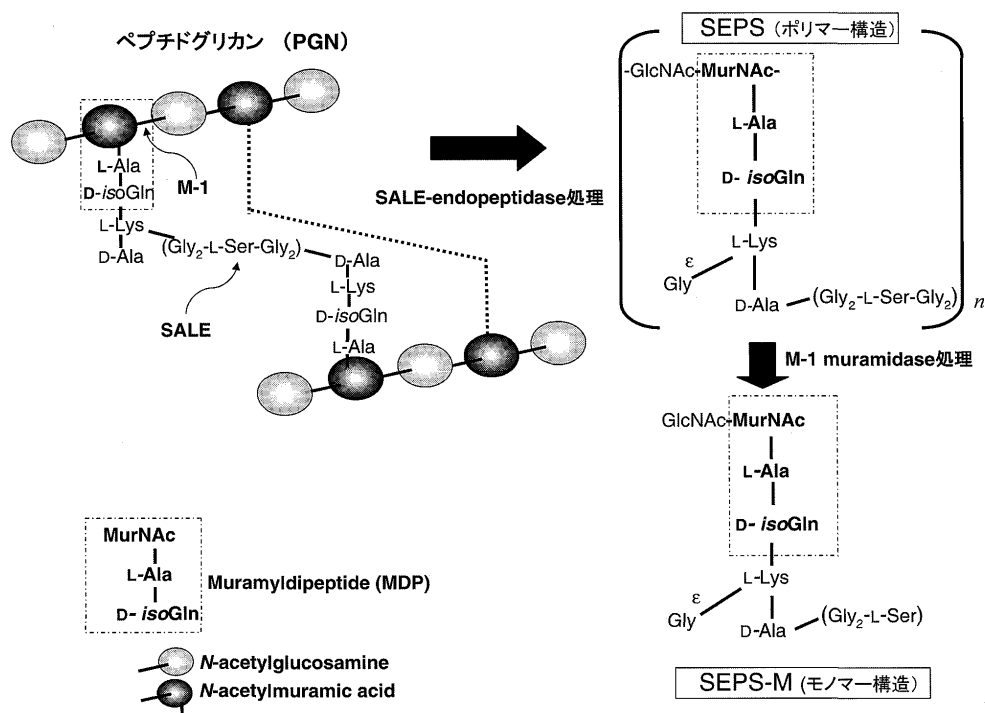


図 1. *S. epidermidis* PGN を酵素で可溶化して調製した SEPS と SEPS-M
PGN の架橋部分を SALE-endopeptidase で切断して可溶性の PGN ポリマーである SEPS を調製する。SEPS のグリカン鎖をさらに M-1 muramidase で分解して PGN モノマーである SEPS-M を調製する。

(Invitrogen) を Opti-MEM 培養液で希釈し軽く攪拌させ 5 分間室温においた。次に、希釈した NOD2 siRNA ないし TLR2 siRNA と Lipofectamine 2000 とを混ぜて軽く攪拌して 20 分間静置したものを上記の 96 穴平底プレートに 50 μ l ずつ加えた。

5. 統計処理

全ての実験は 3 回以上繰り返して実施した。それぞれの試料における測定値の平均と標準偏差 (SD) を算出し、Bonferroni/Dunnett 法により多重比較検定 (ANOVA) を行い、 p 値が 0.05 未満を有意と判定した。相乗作用の有意についても相

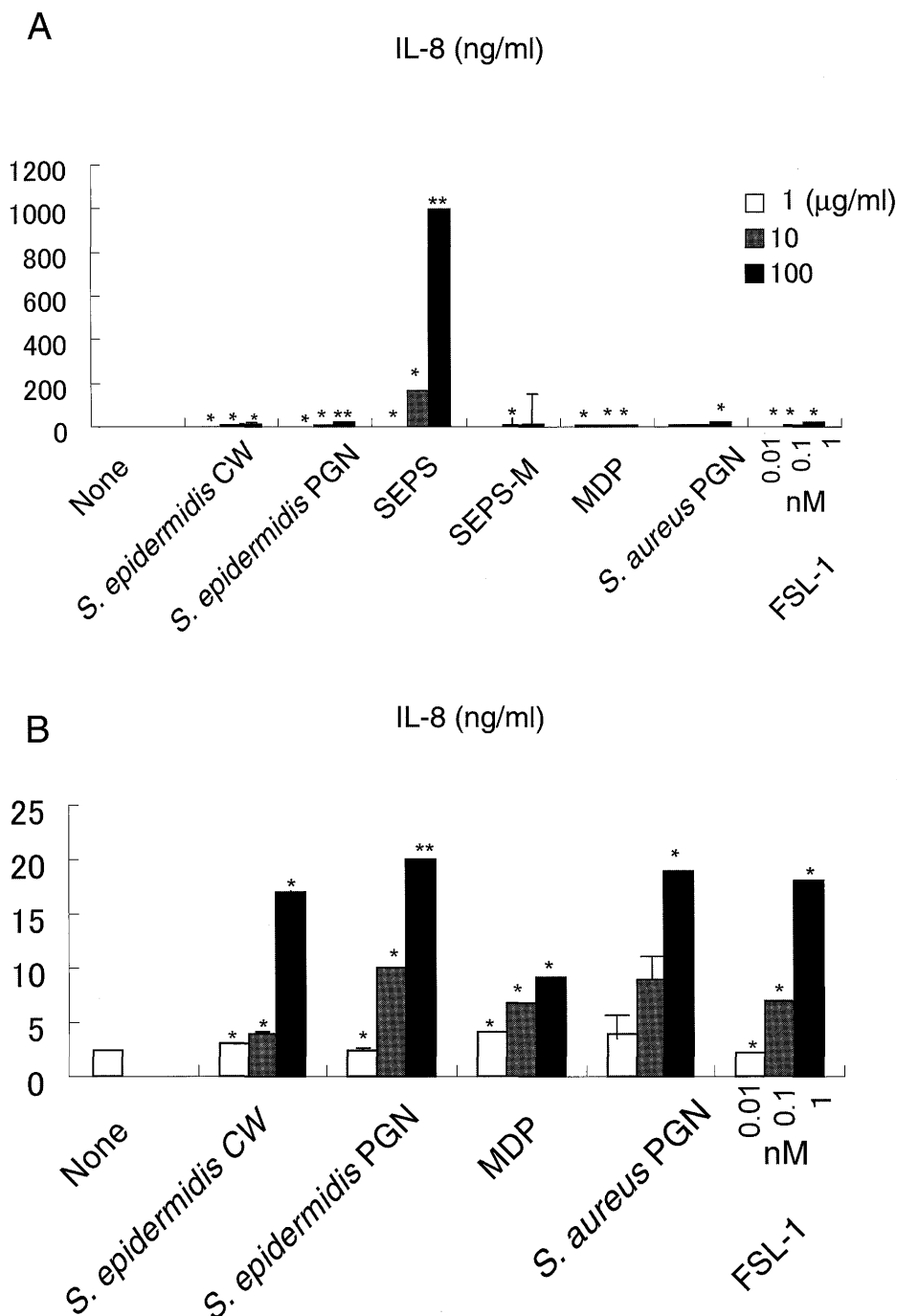


図 2. PGN 関連標品で THP-1 細胞を刺激した時の IL-8 産生誘導

OCT 処理した THP-1 細胞を MDP, SEPS, SEPS-M, *S. epidermidis* PGN, *S. epidermidis* CW, *S. aureus* PGN をそれぞれ 1, 10, 100 μ g/ml, FSL-1 を 0.01, 0.1, 1 nM を加え 10%FCS 添加 RPMI 1640 培養液にて 37°C, 24 時間刺激した。上清中の IL-8 量を ELISA にて測定した。実験は 3 通りずつ実施して、平均値と標準偏差を求めた。同様の実験を 3 回繰り返して行い、代表的な成績を示した。なお、A 図では SEPS が極めて強力な作用を示したため、同じスケールでは他標品の活性の表示が困難となった。そこで SEPS のデータを省いてスケール (縦軸) を変えて B に示した。

**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$; 培養液対照 (None) と比較して統計学的に有意差を認めた。

関要素をANOVA分析して判定した。

結 果

1. SEPS は THP-1細胞に高レベルのサイトカイン産生を誘導する

はじめに, *S. epidermidis* 細胞壁 (CW), PGN, SEPS, SEPS-M と対照標品として市販の *S. aureus* PGN, 合成 NOD2 リガンドの MDP, 合成 TLR2/6 リガンドの FSL-1 でヒト単球系 THP-1 細胞を刺激して IL-8 誘導能を検討した。その

結果, 他の標品に比較して SEPS が圧倒的に強力な IL-8 誘導作用を示した (図 2A)。他の標品も SEPS には及ばないものの, 明確な作用を示した (図 2B)。IL-1 β , ならびに IL-6 誘導に関しても, 程度の差はあるが本質的に同様の傾向が得られた (データは省略)。

2. SEPS の活性は NOD2 ならびに TLR2 を介している

SEPS の強力な作用がどのようなシグナル系に起因するかを探るために, RNAi 法で TLR 系および NOD 系遺伝子発現を抑制したトランスフェクタントを作成し実験を行った。IL-8

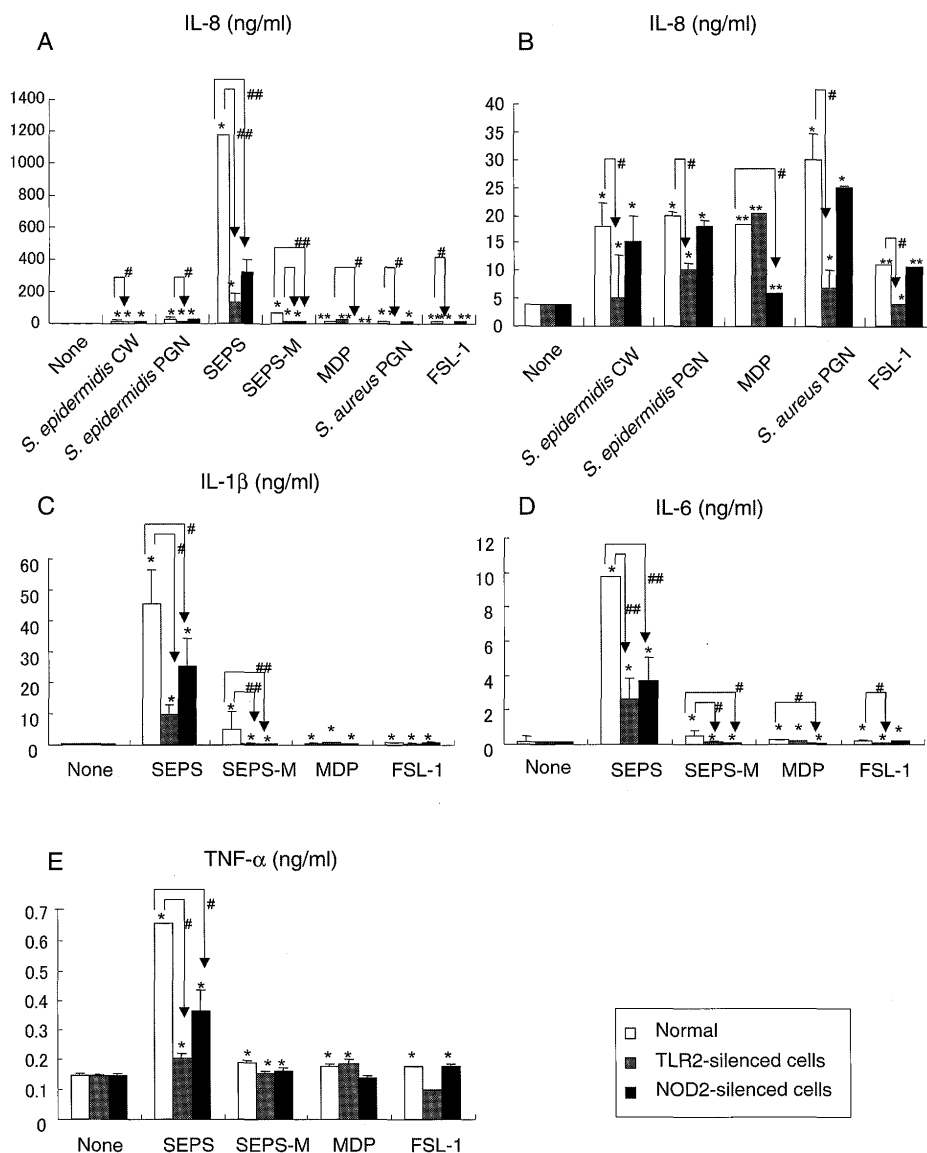


図 3. SEPS の活性は NOD2 ならびに TLR2 を介している

TLR2 もしくは NOD2 特異的 siRNA をトランスフェクトした THP-1 細胞と親細胞を供試して, SEPS (100 μ g/ml), SEPS-M (100 μ g/ml), MDP (100 μ g/ml), *S. epidermidis* PGN (100 μ g/ml), *S. epidermidis* CW (100 μ g/ml), *S. aureus* PGN (100 μ g/ml) および FSL-1 (1 nM) の IL-8 (A, B), IL-1 β (C), IL-6 (D) ならびに TNF- α (E) 誘導能を ELISA 測定した。実験は 3 通りずつ実施して, 平均値と標準偏差を求めた。同様の実験を 3 回繰り返して行い, 代表的な成績を示した。

**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$; 培養液対照 (None) と比較して統計的に有意差を認めた。

**, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$; 遺伝子抑制細胞の反応は陽性対照 (Normal) に比較して統計的に有意に抑制された。

誘導作用に関しては SEPS の強い活性は NOD2 および TLR2 遺伝子発現抑制細胞で激減した (図 3A)。この実験の信頼性を確認する目的でレセプター利用が確定した合成標品でも実験した。これら標品の活性は SEPS に比べると弱いため、図 3A から SEPS のデータを省いてスケール (縦軸) を変えて図 3B に表示した。合成 NOD2 アゴニストである MDP の活性は、NOD2 発現抑制細胞でほぼコントロールレベルにまで減弱している。また、合成 TLR2/6 アゴニストである FSL-1 の活性は、TLR2 発現抑制細胞でコントロールレベルまで減弱している。すなわち、トランスフェクタントを用いた実験成績は信頼できる。ちなみにこの解析で SEPS-M は弱いながら明確な TLR2 活性を示した。次に、SEPS, SEPS-M, MDP および FSL-1 を用いて IL-1 β 産生作用について検討した。ここでも、SEPS

の活性は NOD2 ならびに、TLR2 発現抑制細胞で激減した (図 3C)。さらに、IL-6 産生作用への影響についても実験したところ、やはり SEPS の活性は NOD2 ならびに、TLR2 発現抑制細胞で激減した (図 3D)。TNF- α 産生作用に関しては、全体に活性は弱く、他の標品は明確な作用を示さなかったが、SEPS の活性は NOD2 ならびに、TLR2 発現抑制細胞では、抑制された。

3. MDP と PGN で THP-1 細胞を共刺激すると相乗的なサイトカイン誘導作用が認められた

PGN 構造中の TLR2 アゴニストと NOD2 アゴニストが相乗的に作用することを実証する目的で、NOD2 アゴニストである MDP と TLR2 アゴニストである *S. epidermidis* あるいは *S. aureus* の PGN でヒト単球系 THP-1 細胞を共刺激して、

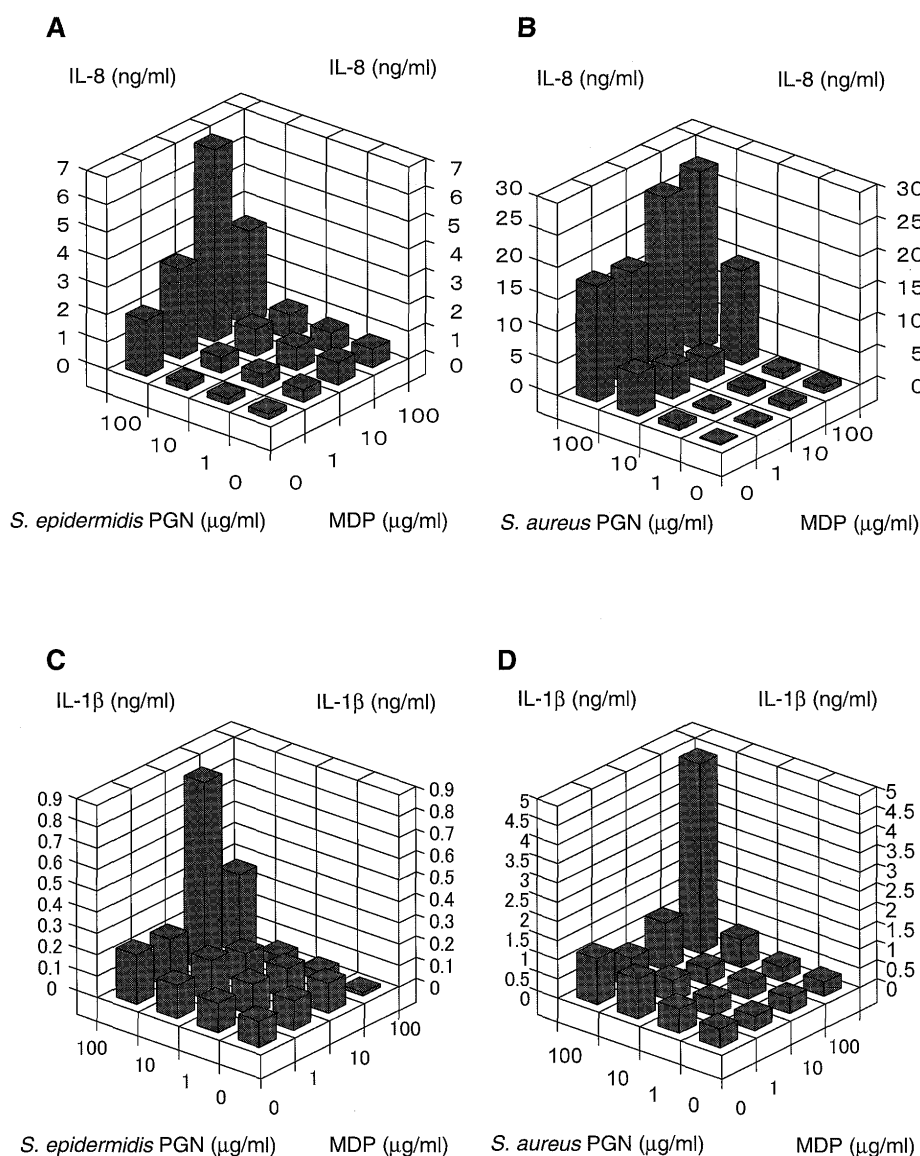


図 4. MDP と PGN でヒト単球系細胞を共刺激すると相乗的なサイトカイン産生誘導がみられた。OCT で処理したヒト単球系 THP-1 細胞を MDP と *S. epidermidis* PGN (A, C) ないし、*S. aureus* PGN (B, D) で刺激して、24 時間後に培養上清中の IL-8, IL-1 β , TNF- α を ELISA 法で測定した。実験は 3 通りずつ実施して、相関要素を ANOVA 分析にて A~D のいずれにおいても統計学的に有意な相乗作用を認めた。

24 時間後に培養上清中の IL-8 ならびに IL-1 β 量を ELISA 法で測定した。その結果、二つの PGN 標品は相乗的に THP-1 細胞を活性化することが明らかになった (図 4)。

考 察

PGN の多彩な免疫生物学的活性に関する研究の歴史は長い¹⁾。特に Freund の完全アジュバンド²³⁾ による抗原特異的な細胞性免疫 (遅延型過敏症) を誘導する作用が、結核菌死菌体中の PGN に起因することが解明²⁴⁾ されて以来、アジュバント活性を担う構造が追求され 1970~1980 年代には化学合成された MDP^{3,4)} と DAP 含有ペプチド²⁵⁾ が登場するに至った。特に MDP については多数の研究によって、PGN の大部分の活性を再現することも確認された^{26,27)}。しかし、これらのレセプターシステムに関しては不明のままであり、前述の通り 2003 年の NOD2-MDP, NOD1-DAP 含有ペプチドの報告を待たなければならなかった。NOD 研究に先行する一連の TLR 研究の中で PGN が主として TLR2 を介して作用を発揮するとの報告が相次いだ¹⁰⁻¹²⁾ が、MDP は TLR2 を活性化しなかった^{13,14)}。そのような背景の下に NOD 分子が細胞内で PGN の部分構造を認識して自然免疫応答を担当することが明らかになると、先行する PGN-TLR2 の知見を疑問視する報告が相次いで公表された^{28,29)}。

本研究で供試した、PGN サブユニットのポリマー型構造を有する SEPS に関しては、TLR2 を活性化することが確認されている¹⁵⁾。しかも SEPS は MDP 構造を有している (図 1)。本研究では SEPS は IL-1 β , IL-6 および IL-8 を強力に誘導した (図 2) が、モノマー型の SEPS-M の活性は SEPS に比較すると著しく弱かった。そこで SEPS の強力な活性は TLR2 と NOD2 を介する刺激が相乗的に作用した結果ではないかと考え、その作業仮説を検証する実験を実施した。まず、RNAi 法によって NOD2 ないし TLR2 遺伝子発現を抑制した細胞では SEPS の強い活性は激減することを証明した (図 3A)。SEPS に比較して活性の弱い SEPS-M に関しても同様の傾向が認められた (図 3B)。この成績は、SEPS-M 中にはグリカン鎖を保持したフラグメントが残存していることを示唆している。不溶性の PGN は SEPS と同様に MDP 構造を有している (図 1) が可溶性の PGN に比較して活性は弱い。これは不溶性の PGN では細胞内の NOD2 を効率よく刺激できないため、主として TLR2 アゴニストとして作用しているのではないかと考えた。そこで、TLR2 アゴニストと考えられる *S. epidermidis* PGN ないし *S. aureus* PGN と NOD2 アゴニストである合成 MDP を共存させて、一種の再構築実験を実施した。その結果、期待通り相乗的な IL-8 ならびに IL-1 β 産生誘導が認められた (図 4)。以上のことより、可溶性のポリマー型ペプチドグリカンである SEPS は細胞内の NOD2 ならびに細胞表層の TLR2 の両経路を活性化することが示唆された。Uehara ら¹⁷⁾ が証明したように、NOD 系と TLR 系のシグナルはいずれも NF- κ B

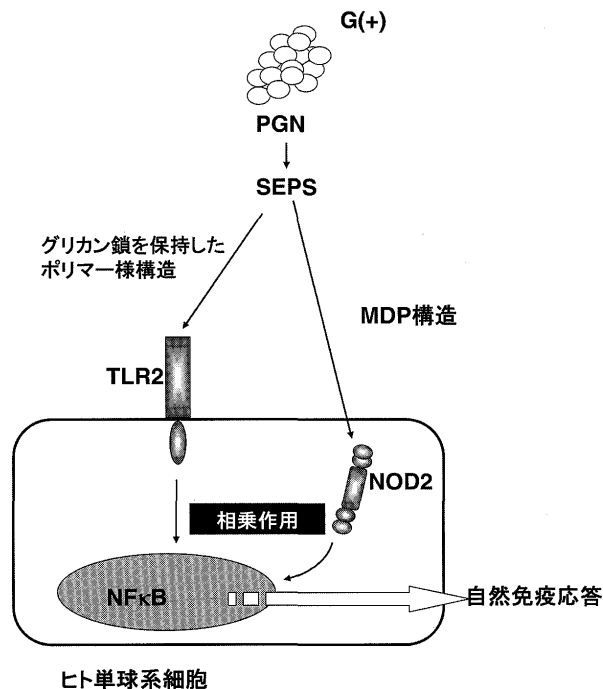


図 5. ヒト単球系細胞の細菌認識と NOD2 ならびに TLR2 を介する自然免疫応答

ポリマー型 PGN の SEPS は細胞内の NOD2 ならびに細胞表層の TLR2 の両経路を活性化する。NOD 系と TLR 系のシグナルは相乗的にヒト単球系細胞を活性化し、強力に自然免疫応答を誘導する。

を活性化して、相乗的にヒト単球系細胞を活性化するので、結果的に極めて強力な自然免疫応答が誘導されるものと考えられる (図 5)。本報告によって可溶性 PGN の強力な生物活性の発現機序が始めて明らかになった。また本報告は一つの菌体成分が複数の活性構造を有してそれらが相乗的な作用を発揮することを示した初めての報告である。

Myhre ら³⁰⁾ も *S. aureus* (L-Lys 型), *Bacillus subtilis* (meso-DAP 型) ならびに *Curtobacterium flaccumfaciens* (L-homoserine 型) の PGN のマウスに対する in vivo 活性は架橋を切断して可溶化する Lysostaphin 処理しても保持されるがグリカン鎖を切断する Cellosyl 処理すると消失すると報告している。彼らはさらに *S. aureus* PGN を Cellosyl 処理して得たおそらくはモノマー型の PGN と、インタクトな *S. aureus* PGN を同時にヒト末梢全血培養系に作用させているが相乗作用は認められなかった。ちなみに、同 PGN モノマーと LPS との組み合わせでは、相乗作用を認めている。おそらく、実験系の違いによるものと思われるが、本研究の知見と異なる理由は不明である。

自然免疫系の細菌認識は、菌体成分に特徴的なパターンを認識する一連の分子が担当する。PGN は細菌種以外には存在しない特有の構造であり、ムラミン酸、D 型アミノ酸、meso-DAP 等の特徴的な成分を有している。哺乳類に寄生しない感染する細菌種の PGN の認識には TLR 系に加え NOD 系さらには PGN 認識蛋白 (PGRP) 系³¹⁾ が関与する。昆虫では

PGRP 系が自然免疫の中核を担うという³²⁾。すなわち、PGN に対する自然免疫には複数のシステムが担保されている。この事実は PGN 認識が宿主の生体防御に果たす役割の重要性を示唆している。宿主細胞と細菌の出会い場で、NOD 系と TLR 系が単独でことにあたる状況は考え難く、必ずや両者の認識と応答は併行して展開するものと考えられる。従って、本研究で明らかになった TLR2 と NOD2 を介する相乗作用は細菌感染の場で充分発現しうる現象と考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始懇切なる御指導、御校閲を受け賜りました口腔外科学分野越後成志教授、口腔微生物学分野 高田春比古教授に謹んで感謝の意を表します。又、本研究の遂行にあたり、実験の詳細にわたって御指導頂きました、口腔微生物学分野の上原亜希子先生に心から感謝の意を表します。最後に、多岐に亘りお力添え頂きました口腔微生物学分野ならびに口腔外科学分野の教職員各位に感謝申し上げます。

文 献

- Seidl, P.H. and Schleifer, K.H. (edit.): Biological properties of peptidoglycan. Walter de Gruyter, Berlin, 1986, pp. 1-436.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477, 1972.
- Kotani, S., Watanabe, Y., Kinoshita, F., Shimono, T., Morisaki, I., Shiba, T., Kusumoto, S., Tarumi, Y. and Ikenaka, K.: Immunoadjuvant activities of synthetic *N*-acetyl-muramyl-peptides or -amino acids. *Biken J.* **18**: 105-111, 1975.
- Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R. and Lederer, E.: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**: 1317-1325, 1974.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L. and Nuñez, G.: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. *J. Biol. Chem.* **278**: 5509-5512, 2003.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J. and Sansonetti, P.J.: Nod2 is general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**: 8869-8872, 2003.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A.M., Antignac, A., Jéhanho, M., Viala, J., Tadin, K., Taha, M.-K., Labigne, A., Zähringer, U., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J. and Philpott, D.J.: Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**: 1584-1587, 2003.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nuñez, G. and Inohara, N.: An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**: 702-707, 2003.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801, 2006.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjyo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-451, 1999.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D.: Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**: 1-5, 1999.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. and Kirschning, C.J.: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**: 17406-17409, 1999.
- Yang, S., Tamai, R., Akashi, S., Takeuchi, O., Akira, S., Sugawara, S. and Takada, H.: Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect. Immun.* **69**: 2045-2053, 2001.
- Vidal, V.F., Castéran, N., Riendeau, C.J., Kornfeld, H., Darcissac, E.C.A., Capron, A. and Bahr, G.M.: Macrophage stimulation with murabutide, an HIV-suppressive muramyl peptide derivative, selectively activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, C/EBP β and STAT1: role of CD14 and Toll-like receptor 2 and 4. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1962-1971, 2001.
- Yoshimura, A., Takada, H., Kaneko, T., Kato, I., Golenbock, D. and Hara, Y.: Structural requirements of muramylpeptides for induction of Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation in CHO cells. *J. Endotoxin Res.* **6**: 407-410, 2000.
- Dziarski, R. and Gupta, D.: *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a Toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect. Immun.* **73**: 5212-5216, 2005.
- Uehara, A., Yang, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Shibata, K., Sugawara, S. and Takada, H.: Muamyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell. Microbiol.* **7**: 53-61, 2005.
- Kubodera, N., Sato, K. and Nishii, Y.: Characteristics of 22-oxacalcitriol (OCT) and 2 β -(3-hydroxypropoxy)-calcitriol (ED-71). Feldman, D., Glorieux, F.H. and Pike, J.W. (edit.): Vitamin D. Academic press, San Diego, 1997,

- pp. 1071-1086.
- 19) Takada, H., Tsujimoto, M., Kotani, S., Kusumoto, S., Inage, M., Shiba, T., Nagao, S., Yano, I., Kawata, S. and Yokogawa, K.: Mitogenic effects of bacterial cell walls, their fragments, and related synthetic compounds on thymocytes and splenocytes of guinea pigs. *Infect. Immun.* **25**: 645-652, 1979.
 - 20) Kawata, S., Takemura, T., Yokogawa, K. and Kotani, S.: Isolation of bacteriolytic endopeptidase from a strain of *Cytophaga* and its application to preparation of hydrosoluble polysaccharide peptide from *Staphylococcus epidermidis* peptidoglycan. *Agr. Biol. Chem.* **48**: 2253-2263, 1984.
 - 21) Harada, K., Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Hirachi, Y., Kusumoto, S., Shiba, T., Kawata, S., Yokogawa, K., Nishimura, H., Kitaura, T. and Nakajima, T.: Liberation of serotonin from rabbit blood platelets by bacterial cell walls and related compounds. *Infect. Immun.* **37**: 1181-1190, 1982.
 - 22) Yokogawa, K., Kawata, S., Takemura, T. and Yoshimura, Y.: Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces globisporus* 1829. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 1533-1543, 1975.
 - 23) Freund, J. and McDermott, K.: Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **49**: 548-553, 1942.
 - 24) Kotani, S., Kitaura, T., Hashimoto, S., Chimori, M. and Kishida, H.: Influence of extraction of 'bound wax D' of BCG with trichloroacetic acid on its adjuvant activity on development of a delayed type of hypersensitivity. *Biken J.* **6**: 321-324, 1964.
 - 25) Kitaura, Y., Nakaguchi, O., Takeno, H., Okada, S., Yonishi, S., Hemmi, K., Mori, J., Senoh, H., Mine, Y. and Hashimoto, M.: N^2 -(γ -D-Glutamyl)-*meso*-2(L), 2'(D)-diaminopimelic acid as the minimal prerequisite structure of FK-156: its acyl derivatives with potent immunostimulating activity. *J. Med. Chem.* **25**: 335-337, 1982.
 - 26) Takada, H. and Kotani, S.: Immunopharmacological activities of synthetic muramyl-peptides. Stewart-Tull, D.E.S. and Davies, M. (edit.): *Immunology of the bacterial cell envelope*. John Wiley & Sons, Chichester, 1985, pp. 119-152.
 - 27) Takada, H. and Kotani, S.: Muramyl dipeptide and derivatives. Stewart-Tull, D.E.S. (edit.): *The theory and practical application of adjuvants*. John Wiley & Sons, Chichester, 1995, pp. 171-202.
 - 28) Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J., Blanot, D., Nahori, M.-A., Werts, C. and Boneca, I.G.: Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* **5**: 1000-1006, 2004.
 - 29) Netea, M.G., Ferwerda, G., de Jong, D.J., Jansen, T., Jacobs, L., Kramer, M., Naber, T.H.J., Drenth, J.P.H., Girardin, S.E., Kullberg, B.J., Adema, G.J. and Van der Meer, J.W.M.: Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J. Immunol.* **174**: 6518-6523, 2005.
 - 30) Myhre, A.E., Stuestøl, J.F., Dahle, M.K., Øverland, G., Thiemermann, C., Foster, S.J., Lilleaasen, P., Aasen, A.O. and Wang, J.E.: Organ injury and cytokine release caused by peptidoglycan are dependent on the structural integrity of the glycan chain. *Infect. Immun.* **72**: 1311-1317, 2004.
 - 31) Dziarski, R. and Gupta, D.: Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cell. Microbiol.* **7**: 1059-1069, 2006.
 - 32) Royet, J., Reichhart, J.-M. and Hoffmann, J.A.: Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 11-17, 2005.